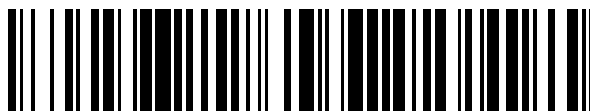


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 975**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2015 PCT/US2015/065890**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16100388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015 E 15820756 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3234188**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos en base exponencial mayor de 2**

30 Prioridad:

15.12.2014 US 201462092102 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.06.2020

73 Titular/es:

**CEPHEID (100.0%)
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089 , US**

72 Inventor/es:

HIGUCHI, RUSSELL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 764 975 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Amplificación de ácidos nucleicos en base exponencial mayor de 2

5 **Campo**

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren generalmente al campo de la amplificación de ácidos nucleicos. En particular, se describen en el presente documento métodos y composiciones para aumentar la eficacia de la amplificación.

10

Antecedentes

Está disponible una amplia variedad de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, y muchos se han empleado en la implementación de ensayos diagnósticos sensibles basados en la detección de ácidos nucleicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sigue siendo el método de amplificación y cuantificación del ADN más ampliamente utilizado. La PCR anidada, una PCR en dos etapas, se usa para aumentar la especificidad y la sensibilidad de la PCR (patente de Estados Unidos n.º 4.683.195). Los cebadores anidados para su uso en la amplificación de la PCR son oligonucleótidos que tienen la secuencia complementaria de una región en una secuencia diana entre los sitios de direccionamiento del cebador inverso y el cebador directo. Sin embargo, la PCR en general tiene algunas limitaciones. La amplificación por PCR solamente puede conseguir menos de dos veces de aumento de la cantidad de la secuencia diana en cada ciclo. Sigue siendo relativamente lenta. Además, la sensibilidad de este método es normalmente limitada, haciendo difícil detectar dianas que pueden estar presentes en solo unas pocas moléculas en una única reacción.

15

20

25 **Sumario**

Se describen en el presente documento métodos y composiciones basados en el uso de novedosos cebadores (por ejemplo, novedosos cebadores internos) diseñados con el fin de que el sitio de unión al cebador externo se mantenga en los amplicones producidos tras la amplificación.

30

Se proporcionan en el presente documento las siguientes realizaciones:

Realización 1: Un conjunto de cebadores de ácidos nucleicos para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el ácido nucleico diana incluye una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en la que la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, incluyendo el primer conjunto oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos dos primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en el que al menos los dos primeros cebadores incluyen un primer cebador externo y un primer cebador interno, incluyendo el primer cebador externo una secuencia de cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**; e incluyendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en la que **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en la que la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que incluye:

35

40

45

una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario; y

una secuencia de cierre **c** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**, en la que la secuencia de cierre **c** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **d'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **a'**.

50

Realización 2: El conjunto de cebadores de la realización 1, en el que el conjunto de cebadores incluye adicionalmente al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde.

55

Realización 3: Un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el ácido nucleico diana incluye una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en la que la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, incluyendo el método:

(a) poner en contacto la muestra con:

60

(i) al menos dos primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en el que los al menos dos primeros cebadores comprenden un primer cebador externo y un primer cebador interno,

incluyendo el primer cebador externo una secuencia de cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**; y

65

incluyendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en la que **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en la que la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que incluye:

5 una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario; y

10 una secuencia de cierre **c** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**, en la que la secuencia de cierre **c** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **d'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **a'**; y

15 (ii) al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde, en el que la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones en las que los cebadores se hibridan con sus hebras molde, si están presentes; y

20 (b) amplificar el ácido nucleico diana, de existir, usando una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', en condiciones donde se produce el desplazamiento de las hebras, para producir amplicones que comprenden las secuencias que se extienden desde la secuencia molde **a'** hasta el sitio de unión del segundo cebador.

Realización 4: El conjunto de cebadores o el método de cualquier realización anterior, en el que la ADN polimerasa incluye una actividad de desplazamiento de cadenas.

25 Realización 5: El conjunto de cebadores o el método de cualquier realización anterior, en el que la T_m de la secuencia combinada **c-a**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **a-b**, en forma bicatenaria.

30 Realización 6: El conjunto de cebadores o el método de cualquier realización anterior, en el que la secuencia combinada **c-a** es más rica en GC que la secuencia combinada **a-b**, y/o contiene más bases estabilizantes.

Realización 7: El método de las realizaciones 3-6, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $3^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR.

35 Realización 8: El método de las realizaciones 3-7, en el que dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente 12 % - 42 % menos ciclos de amplificación que lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

40 Realización 9: El conjunto de cebadores de las realizaciones 1, 2, 5 o 6 o el método de las realizaciones 3-8, en el que el segundo cebador incluye oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos dos segundos cebadores capaces de hibridarse con la segunda hebra molde, en el que los al menos dos segundo cebadores comprenden un segundo cebador externo y un segundo cebador interno, incluyendo el segundo cebador externo una secuencia del cebador **e** que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **e'**;

45 e incluyendo el segundo cebador una secuencia del cebador **f** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **f'**, en la que **f'** es adyacente a, y en 5' de, **e'**, y en la que la secuencia del cebador **f** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario incluyendo:

50 una secuencia del cebador **e** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **f** monocatenario; y

55 una secuencia de cierre **g** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e**, en la que la secuencia de cierre **g** no es complementaria de la secuencia de la segunda hebra molde **h'**, es adyacente a, y en 3', de la secuencia de la segunda hebra molde **e'**.

Realización 10: El conjunto de cebadores o el método de la realización 9, en el que la T_m de la secuencia combinada **g-e**, en forma bicatenaria es mayor que la de la secuencia combinada **e-f**, en forma bicatenaria.

60 Realización 11: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 9 o 10, en el que la secuencia combinada **g-e** es más rica en GC que la secuencia combinada **e-f**, y/o contiene más bases estabilizantes.

Realización 12: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 9-11, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $6^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR.

65 Realización 13: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 9-12, en el que dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente 36 % -

66 % menos ciclos de amplificación que lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

5 Realización 14: El conjunto de cebadores o el método de cualquier realización anterior, en el que la(s) secuencia(s) de cierre **c** y **g**, de existir, no es/son capaz(es) de copiarse durante la amplificación.

Realización 15: El conjunto de cebadores o el método de la realización 14, en el que la(s) secuencia(s) de cierre **c** y/o **g**, de existir, comprende(n) 2'-O-metil ARN.

10 Realización 16: El conjunto de cebadores o el método de cualquier realización anterior, en el que la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno y/o el segundo cebador interno, de existir, no incluye una secuencia en horquilla.

15 Realización 17: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 3-15, en el que la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno incluye una secuencia en horquilla en el que la secuencia de cierre **c** está unida a la secuencia complementaria **c'** y/o la secuencia del cebador bicatenario del segundo cebador interno, de existir, incluye una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **g** está unida a la secuencia complementaria **g'**.

20 Realización 18: Un conjunto de cebadores de ácidos nucleicos para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el ácido nucleico diana incluye una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en la que la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, incluyendo el primer conjunto oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos tres primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en el que los al menos tres primeros cebadores comprende un primer cebador externo, un primer cebador intermedio, y un primer cebador interno,

25
 30 incluyendo el primer cebador externo una secuencia del cebador **d** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **d'**;
 incluyendo el primer cebador intermedio una secuencia del cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**, en la que **a'** es adyacente a, y en 5' de, **d'**, y en la que la secuencia del cebador **a** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario incluyendo:

35 una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a** monocatenario; y

una secuencia de cierre **c1** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en la que la secuencia de cierre **c1** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **i'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **d'**; e

40 incluyendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en la que **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en la que la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que incluye:

45 una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario;

una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**; y

50 una secuencia de cierre **c2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en la que la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de secuencia de la primera hebra molde **i'**.

Realización 19: El conjunto de cebadores de la realización 18, en el que el conjunto de cebadores incluye adicionalmente al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde.

55 Realización 20: Un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el ácido nucleico diana incluye una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en la que la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, incluyendo el método:

60 (a) poner en contacto la muestra con:

(i) al menos tres primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en el que los al menos tres primeros cebadores comprende un primer cebador externo, un primer cebador intermedio, y un primer cebador interno,

65 incluyendo el primer cebador externo una secuencia del cebador **d** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **d'**;

incluyendo el primer cebador intermedio una secuencia del cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**, en la que **a'** es adyacente a, y en 5' de, **d'**, y en la que la secuencia del cebador **a** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario incluyendo:

una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a** monocatenario; y

una secuencia de cierre **c1** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en la que la secuencia de cierre **c1** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **i'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **d'**; y

incluyendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en la que **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en la que la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que incluye:

una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario;

una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**; y

una secuencia de cierre **c2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en la que la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de secuencia de la primera hebra molde **i'**; y

(ii) al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde, en el que la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones en las que los cebadores se hibridan con sus hebras molde, si están presentes; y

(b) amplificar el ácido nucleico diana, de existir, usando una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', en condiciones donde se produce el desplazamiento de las hebras, para producir amplicones que comprenden las secuencias que se extienden desde la secuencia molde **a'** hasta el sitio de unión del segundo cebador.

Realización 21: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-20, en el que la ADN polimerasa incluye una actividad de desplazamiento de cadenas.

Realización 22: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-21, en el que **g1** tiene una secuencia diferente de **g2**.

Realización 23: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-22, en el que la T_m de la secuencia combinada **c1-d**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **d-a**, en forma bicatenaria, y la T_m de la secuencia combinada **c2-d-a**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **d-a-b**, en forma bicatenaria.

Realización 24: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-23, en el que la secuencia combinada **c1-d** es más rica en GC que la secuencia combinada **d-a**, y/o contiene más bases estabilizantes, y la secuencia combinada **c2-d-a** es más rica en GC que la secuencia combinada **d-a-b**, y/o contiene más bases estabilizantes que la secuencia combinada **d-a-b**.

Realización 25: El método de las realizaciones 20-24, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $4^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR.

Realización 26: El método de las realizaciones 20-25, en el que dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente 25 % - 55 % menos ciclos de amplificación que lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

Realización 27: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-26, en el que el segundo cebador incluye oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos tres segundos cebadores capaces de hibridarse con la segunda hebra molde, en el que los al menos tres segundos cebadores comprenden un segundo cebador externo, un segundo cebador intermedio, y un segundo cebador interno, incluyendo el segundo cebador externo una secuencia del cebador **h** que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **h'**; incluyendo el segundo cebador intermedio una secuencia del cebador **e** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **e'**, en la que **e'** es adyacente a, y en 5' de, **h'**, y en la que la secuencia del cebador **e** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una

secuencia del cebador bicatenario incluyendo:

una secuencia del cebador **h** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e** monocatenario; y

5 una secuencia de cierre **g1** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **h**, en la que la secuencia de cierre **g1** no es complementaria de una secuencia de la segunda hebra molde **i'**, es adyacente a, y en 3', de la secuencia de la segunda hebra molde **h'**; e

10 incluyendo el segundo cebador una secuencia del cebador **f** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **f'**, en la que **f'** es adyacente a, y en 5' de, **e'**, y en la que la secuencia del cebador **f** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario incluyendo:

15 una secuencia del cebador **e** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **f** monocatenario;

una secuencia del cebador **h** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e**; y

20 una secuencia de cierre **g2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **h**, en la que la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de secuencia de la primera hebra molde **j'**.

Realización 28: El conjunto de cebadores o el método de la realización 27, en el que la T_m de la secuencia combinada **g1-h**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **h-e**, en forma bicatenaria, y la T_m de la secuencia combinada **g2-h-e**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **h-e-f**, en forma bicatenaria.

25 Realización 29: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 27 o 28, en el que la secuencia combinada **g1-h** es más rica en GC que la secuencia combinada **h-e**, y/o contiene más bases estabilizantes, y la secuencia combinada **g2-h-e** es más rica en GC que la secuencia combinada **h-e-f**, y/o contiene más bases estabilizantes que la secuencia combinada **h-e-f**.

30 Realización 30: El método de las realizaciones 27-29, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $8^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR.

35 Realización 31: El método de las realizaciones 27-30, en el que dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente 42 % - 72 % menos ciclos de amplificación que lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

40 Realización 32: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-31, en el que las secuencias de cierre **c1** y **c2**, y **g1** y **g2**, de existir, no pueden copiarse durante la amplificación.

Realización 33: El conjunto de cebadores o el método de la realización 32, en el que las secuencias de cierre **c1** y **c2**, y **g1** y **g2**, de existir, incluyen 2'-O-metil ARN.

45 Realización 34: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 20-33, en el que: la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno y el primer cebador intermedio; y/o el segundo cebador interno y el segundo cebador intermedio, de existir, no comprende(n) una secuencia en horquilla.

50 Realización 35: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 20-33, en el que: la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno incluye una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **c2** está unida a la secuencia complementaria **c2'**; y/o la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador intermedio incluye una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **c1** está unida a la secuencia complementaria **c1'**; y/o la secuencia del cebador bicatenario del segundo cebador interno, de existir, incluye una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **g2** está unida a la secuencia complementaria **g2'**; y/o la secuencia del cebador bicatenario del segundo cebador intermedio, de existir, incluye una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **g1** está unida a la secuencia complementaria **g1'**.

Realización 36: El método de las realizaciones 3-17 o 20-35, en el que la amplificación incluye la PCR.

60 Realización 37: El método de las realizaciones 3-17 o 20-36, en el que la ADN polimerasa incluye la actividad de desplazamiento de cadenas y es termoestable.

Realización 38: El método de las realizaciones 3-17 o 20-37, en el que el método incluye detectar, y opcionalmente cuantificar, el ácido nucleico diana.

65 Realización 39: El método de las realizaciones 3-17 o 20-38, en el que la muestra consiste en ácidos nucleicos

procedentes de una única célula.

Realización 40: El conjunto de cebadores o el método de cualquiera de las realizaciones 1-6, en el que la secuencia combinada **a-b** contiene más bases desestabilizantes que la secuencia combinada **c-a**.

Realización 41: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 9-11, en el que la secuencia combinada **e-f** contiene más bases desestabilizantes que la secuencia combinada **g-e**.

Realización 42: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 18-24, en el que la secuencia combinada **d-a** contiene más bases desestabilizantes que la secuencia combinada **c1-d**, y/o la secuencia combinada **d-a-b** contiene más bases desestabilizantes que la secuencia combinada **c2-d-a**.

Realización 43: El conjunto de cebadores o el método de las realizaciones 27-29, en el que la secuencia combinada **h-e** contiene más bases desestabilizantes que la secuencia combinada **g1-h**, y/o la secuencia combinada **h-e-f** contiene más bases desestabilizantes que la secuencia combinada **g2-h-e**.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Un esquema que muestra la PCR completamente anidada que se lleva a cabo en un molde de ADN bicatenario. Los cebadores flanqueantes son como describe para la Figura 2 y la Figura 3.

Figura 2: Un esquema que muestra un conjunto ilustrativo de dos cebadores hibridados con un extremo de la secuencia de nucleótidos diana. Este conjunto puede ser, por ejemplo, un conjunto de cebadores directos. Se muestran diferentes segmentos de la secuencias del cebador (**a, b, c**); las secuencias complementarias están indicadas como (**a', b', c'**). Las secuencias molde están indicadas 3'-5' como **d', a'**, y **b'**. El cebador externo (**a**) es monocatenario. El cebador interno tiene una porción monocatenaria (**b**) y una porción bicatenaria (**a-c**).

Figura 3: Un esquema que muestra un conjunto ilustrativo de dos cebadores hibridados con el extremo opuesto de la secuencia de nucleótidos diana que se muestra en la Fig. 2. Este conjunto puede ser, por ejemplo, un conjunto de cebadores inversos. Se muestran diferentes segmentos de la secuencias del cebador (**e, f, g**); las secuencias complementarias están indicadas como (**e', f, g'**). Las secuencias molde están indicadas 3'-5' como **h', e'**, y **f'**. El cebador externo (**e**) es monocatenario. El cebador interno tiene una porción monocatenaria (**f**) y una porción bicatenaria (**a-g**).

Figura 4: Un esquema que muestra un conjunto ilustrativo de tres cebadores hibridados con un extremo de la secuencia de nucleótidos diana. Este conjunto puede ser, por ejemplo, un conjunto de cebadores directos. Se muestran diferentes segmentos de la secuencias del cebador (**a, b, c1, c2, d**); las secuencias complementarias están indicadas como (**a', b', c1', c2', d'**). Las secuencias molde están indicadas 3'-5' como **i', d', a'** y **b'**. El cebador externo (**d**) es monocatenario. El cebador intermedio tiene una porción monocatenaria (**a**) y una porción bicatenaria (**d-c1**). El cebador interno tiene una porción monocatenaria (**b**) y una porción bicatenaria (**a-d-c2**).

Figura 5: Un esquema que muestra un conjunto ilustrativo de tres cebadores hibridados con el extremo opuesto de la secuencia de nucleótidos diana que se muestra en la Fig. 4. Este conjunto puede ser, por ejemplo, un conjunto de cebadores inversos. Se muestran diferentes segmentos de la secuencias del cebador (**e, f, g1, g2, h**); las secuencias complementarias están indicadas como (**e', f', g1', g2', h'**). Las secuencias molde están indicadas 3'-5' como **j', h', e'**, y **f'**. El cebador externo (**d**) es monocatenario. El cebador intermedio tiene una porción monocatenaria (**e**) y una porción bicatenaria (**h-g1**). El cebador interno tiene una porción monocatenaria (**f**) y una porción bicatenaria (**e-h-g2**).

Figura 6A-B: Un dibujo esquemático que muestra dos estructuras alternativas para el cebador ilustrado que tiene una secuencia de cierre cuando se deja hibridar el cebador con el molde. Un inactivador fluorescente (Q) está presente en el cebador en una posición donde inactiva una marca fluorescente correspondiente (F) en la hebra molde. En el Ejemplo 1, se llevó a cabo un experimento en el que se midió la T_m del cebador y una secuencia diana complementaria con y sin el cierre presente. (A) La estructura formada si la T_m de la secuencia combinada **c-a**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **a-b**, en forma bicatenaria. (B) La estructura formada si la T_m de la secuencia combinada **c-a**, en forma bicatenaria, es menor que la de la secuencia combinada **a-b**, en forma bicatenaria.

Figura 7A-B: (A) Un dibujo esquemático que muestra un conjunto ilustrativo de dos cebadores en el que un inactivador fluorescente (Q) está presente en el cebador interno en una posición donde inactiva una marca fluorescente correspondiente en la hebra molde. (B) Intensidad de la fluorescencia en función del tiempo de la reacción de extensión del cebador del Ejemplo 2. Las tres trazas crecientes son reacciones separadas con cierres ligeramente diferentes; La traza plana es sin que esté presente el cebador (flanqueante), desplazando al cebador presente.

Descripción detallada

Definiciones

- 5 Los términos utilizados en las reivindicaciones y especificaciones se definen como se establece a continuación a menos que se especifique lo contrario.
- 10 El término "ácido nucleico" se refiere a un polímero de nucleótidos y, salvo que se limite de otra forma, incluye análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar (por ejemplo, hibridarse) a los nucleótidos de origen natural.
- 15 El término ácido nucleico incluye cualquier forma de ADN o ARN, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico; ADN complementario (ADNc), que es una representación de ADN del ARNm, obtenida usualmente mediante transcripción inversa del ARN mensajero (ARNm) o mediante amplificación; moléculas de ADN producidas sintéticamente o mediante amplificación; ARNm; y ARN no codificante.
- 20 El término ácido nucleico abarca complejos de ácidos nucleicos bicatenario o tricatenarios, así como moléculas monocatenarias. En complejos de ácidos nucleicos bicatenario o tricatenarios, las hebras de ácidos nucleicos no tienen que ser coextensas (es decir, un ácido nucleico bicatenario no tiene que ser bicatenario para la longitud completa de ambas hebras).
- 25 El término ácido nucleico abarca también cualquier modificación química del mismo, tales como mediante metilación y/o protección. Las modificaciones del ácido nucleico pueden incluir la adición de grupos químicos que incorporan una carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática, y funcionalidad a las bases de ácidos nucleicos individuales o al ácido nucleico en su conjunto. Dichas modificaciones pueden incluir modificaciones de bases tales como las modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de la pirimidina en posición 5, modificaciones de la purina en posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas de citosina, sustituciones de 5-bromo-uracilo, modificaciones en la estructura principal del azúcar-fosfato, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares.
- 30 Más concretamente, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos, pueden incluir polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro tipo de ácido nucleico que sea un N-glicósido o C-glicósido de una base de purina o pirimidina, así como otros polímeros que contienen estructuras principales no nucleotídicas, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y polímeros de polimorfolino (comercialmente disponibles de Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregón, como Neugene), y otros polímeros de ácidos nucleicos específicos de secuencias sintéticas siempre que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el emparejamiento de bases y el apilado de bases, tal como aparece en el ADN y el ARN. El término ácido nucleico abarca también ácidos nucleicos bloqueados (LNA), que se describen en las patentes de Estados unidos números 6.794.499, 6.670.461, 6.262.490, y 6.770.748,
- 35
- 40 El uno o varios ácidos nucleicos se pueden derivar de un proceso de síntesis completamente química, tal como una síntesis química mediada por fase sólida, a partir de una fuente biológica, tal como a través de aislamiento a partir de cualquier especie que produzca ácido nucleico, o de procesos que implican la manipulación de ácidos nucleicos mediante herramientas de biología molecular, tal como la replicación del ADN, amplificación por PCR, transcripción inversa, o a partir de una combinación de estos procesos.
- 45
- 50 Como se usa en el presente documento, el término "complementario" se refiere a la capacidad de emparejar de forma precisa dos nucleótidos; es decir, si un nucleótido en una posición dada de un ácido nucleico puede unirse mediante enlace de hidrógeno con un nucleótido de otro ácido nucleico para formar un par de bases convencionales, entonces, se considera que los dos ácidos nucleicos son complementarios entre sí en esta posición. La complementariedad entre dos moléculas de ácidos nucleicos bicatenarias puede ser "parcial", en que solo alguno de los nucleótidos se une, o puede ser completa cuando existe la complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la intensidad de la hibridación entre las hebras de ácido nucleico.
- 55 "Hibridación específica" se refiere a la unión de un ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos en ausencia de unión sustancial con otras secuencias de nucleótidos presentes en la mezcla de hibridación en condiciones rigurosas definidas. Los expertos en la materia reconocen que relajar el rigor de las condiciones de hibridación permite que se toleren emparejamientos incorrectos de secuencias.
- 60 En algunas realizaciones, las hibridaciones se llevan a cabo en condiciones de hibridación rigurosas. La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere generalmente a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 20 °C o 25 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Como se usa en el presente documento, la T_m es la temperatura a la cual una población de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios queda semidisociada en hebras individuales. Los métodos para calcular la T_m de los ácidos nucleicos son bien conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, Berger y Kimmel (1987) METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 152: GUIDE TO MOLECULAR CLONING
- 65

TECHNIQUES, San Diego: Academic Press, Inc. y Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ED., VOLS. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory), ambas incorporadas al presente documento por referencia de sus descripciones de condiciones de hibridación rigurosas). Como se indica por las referencias convencionales, se puede calcular una estimación simple del valor de la T_m mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41(\% G+C)$, cuando un ácido nucleico está en una solución acuosa de NaCl 1 M (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985)). La temperatura de fusión de un híbrido (y por tanto las condiciones para una hibridación rigurosa está afectada por diversos factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de las bases) del cebador o la sonda y la naturaleza del ácido nucleico diana (ADN, ARN, composición de las bases, presentes en solución o inmovilizadas, y similares), así como la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol). Los efectos de estos factores son bien conocidos y se describen en las referencias convencionales en la materia. Las condiciones rigurosas ilustrativas adecuadas para conseguir la hibridación específica de la mayoría de las secuencias son: una temperatura de al menos aproximadamente 60 °C y una concentración salina de aproximadamente 0,2 molar a pH7. El cálculo de la T_m para secuencias de oligonucleótidos basadas sobre la termodinámica vecinos más cercanos puede llevarse a cabo como se describe en "A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics" John SantaLucia, Jr., PNAS 17 de febrero, 1998 vol. 95 n.º 4 1460-1465

El término "oligonucleótido" se usa para referirse a un ácido nucleico que es relativamente corto, generalmente más corto que 200 nucleótidos, más particularmente, más corto que 100 nucleótidos, más concretamente, más corto que 50 nucleótidos. Normalmente, los oligonucleótidos son moléculas de ADN monocatenarias.

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse (denominado también "hibridación") con un ácido nucleico y que sirve como un sitio de inicio para la polimerización del nucleótido (ARN o ADN) en condiciones adecuadas (es decir, en presencia de cuatro diferentes nucleósido trifosfatos y un agente para la polimerización, tal como la ADN o ARN polimerasa o la transcriptasa inversa) en un tampón adecuado y a una temperatura adecuada. La longitud adecuada de un cebador depende del uso previsto del cebador, pero los cebadores tienen normalmente al menos 7 nucleótidos de longitud y, en algunas realizaciones, un intervalo de 10 a 30 nucleótidos, o, en algunas realizaciones, de 10 a 60 nucleótidos, de longitud. En algunas realizaciones, los cebadores pueden tener, por ejemplo, de 15 a 50 nucleótidos de longitud. Las moléculas de cebadores cortos requieren generalmente temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero debe ser suficientemente complementario para hibridarse con un molde.

Se dice que un cebador se hibrida con otro ácido nucleico si el cebador, o una porción del mismo, se hibrida con una secuencia de nucleótidos en el ácido nucleico. La indicación de que un cebador se hibrida con una secuencia de nucleótidos concreta no se pretende que implique que el cebador se hibrida tanto de forma completa como exclusiva con la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cebadores de la amplificación usados en el presente documento se dice que se "hibridan a" o son "específicos de" una secuencia de nucleótidos". Esta descripción abarca cebadores que se hibridan completamente con la secuencia de nucleótidos, así como cebadores que se hibridan parcialmente con la secuencia de nucleótidos.

La expresión "pareja de cebadores" se refiere a un conjunto de cebadores que incluyen un "cebador en la dirección 5'" o "cebador directo" que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de ADN que se va a amplificar y un "cebador en la dirección 3'" o "cebador inverso" que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia que se va a amplificar. Como reconocerán los expertos en la materia, no se pretende que los términos "en la dirección 5'" y "en la dirección 3'" o "directo" e "inverso" sean limitantes, sino más bien proporcionan orientaciones ilustrativas en algunas realizaciones.

Una "sonda" es un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de la secuencia de complementariedad mediante uno o más tipos de enlaces químicos, generalmente a través del emparejamiento de bases complementarias, usualmente mediante la formación de enlaces de hidrógeno, formando por tanto una estructura en duplete. La sonda puede marcarse con una sonda detectable para permitir la detección fácil de la sonda, particularmente una vez que la sonda se ha hibridado con su diana complementaria. Alternativamente, sin embargo, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable mediante unión específica con un ligando que está marcado, ya sea directa o indirectamente. Las sondas pueden variar significativamente de tamaño. Generalmente, las sondas tienen al menos 7 a 15 nucleótidos de longitud. Otras sondas tienen al menos 20, 30, o 40 nucleótidos de longitud. Otras sondas más son algo más largas, teniendo al menos 50, 60, 70, 80, o 90 nucleótidos de longitud. Otras sondas más son todavía más largas, y tienen al menos 100, 150, 200 o más nucleótidos de longitud. Las sondas pueden ser también de cualquier longitud que esté comprendido dentro de cualquier intervalo delimitado por cualquiera de los anteriores valores (por ejemplo, 15-20 nucleótidos de longitud).

El cebador o la sonda puede ser perfectamente complementario a la secuencia de nucleótidos diana o puede ser menos de perfectamente complementario. En algunas realizaciones, el cebador tiene al menos un 65 % de identidad con el complemento de la secuencia de nucleótidos diana sobre una secuencia de al menos 7 nucleótidos, más normalmente sobre una secuencia en el intervalo de 10-30 nucleótidos, y, en algunas realizaciones, sobre una

secuencia de al menos 14-25 nucleótidos, y, en algunas realizaciones, tiene al menos un 75 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, o al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad. Debe entenderse que determinadas bases (por ejemplo, la base en 3' de un cebador) tienen generalmente una complementariedad perfectamente deseable con las bases correspondientes de la secuencia de nucleótidos diana. El cebador y las sondas se hibridan normalmente con la secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas.

Como se usa en el presente documento con referencia a una porción de un cebador o una secuencia de nucleótidos comprendida en el cebador, la expresión "especifico de" un ácido nucleico, se refiere a un cebador o secuencia de nucleótidos que se puede hibridar específicamente al ácido nucleico diana en condiciones de hibridación adecuadas.

La amplificación de acuerdo con las presente enseñanzas abarca cualquier medio por el cual se reproduce al menos una parte de al menos un ácido nucleico diana, normalmente de una manera dependiente del molde, incluyendo sin limitación, un amplio intervalo de técnicas para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos, tanto lineal como exponencialmente. los medios ilustrativos para llevar a cabo una etapa de amplificación incluyen la PCR, amplificación basada en una hebra de ácido nucleico (NASBA), amplificaciones multiplexadas en dos etapas, amplificación de círculo rodante (RCA), y similares, incluyendo versiones multiplexadas y combinaciones de las mismas, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, OLA/PCR, PCR/OLA, LDR/PCR, PCR/PCR/IDR, PCR/IDR, LCR/PCR, PCR/ICR (conocida también como reacción de cadena combinada—CCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), y similares. Se pueden encontrar descripciones de dichas técnicas en, entre otras fuentes, Ausubel et al.; PCR Primer: A Laboratory Manual, Difffenbach, Ed., Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book, Chang Bioscience (2002); Msuih et al., J. Clin. Micro. 34:501-07 (1996); The Nucleic Acid Protocols Handbook, R. Rapley, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (2002); Abramson et al., Curr Opin Biotechnol. Feb 1993.;4(1):41-7, patente de EE.UU. n.º 6.027.998; patente de EE.UU. n.º 6.605.451, Barany et al., Publicación PCT n.º WO 97/31256; Wenz et al., Publicación PCT n.º WO 01/92579; Day et al., Genomics, 29(1): 152-162 (1995), Ehrlich et al., Science 252:1643-50 (1991); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990); Favis et al., Nature Biotechnology 18:561-64 (2000); y Rabenau et al., Infection 28:97-102 (2000); Belgrader, Barany, y Lubin, Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay, Sixth International Symposium on Human Identification, 1995 (disponible en la world wide web en: promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html); LCR Kit Instruction Manual, n.º de Cat. 200520, n.º de Rev. 050002, Stratagene, 2002; Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:188-93 (1991); Bi y Sambrook, Nucl. Acids Res. 25:2924-2951 (1997); Zirvi et al., Nucl. Acid Res. 27:e40i-viii (1999); Dean et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:5261-66 (2002); Barany y Gelfand, Gene 109:1-11 (1991); Walker et al., Nucl. Acid Res. 20:1691-96 (1992); Polstra et al., BMC Inf. Dis. 2:18- (2002); Lage et al., Genome Res. Feb 2003.;13(2):294-307, y Landegren et al., Science 241:1077-80 (1988), Demidov, V., Expert Rev Mol Diagn. Nov 2002.;2(6):542-8., Cook et al., J Microbiol Methods. Mayo 2003;53(2): 165-74, Schweitzer et al., Curr Opin Biotechnol. Feb 2001.; 12(1):21-7, patente de EE.UU. n.º 5.830.711, patente de EE.UU. n.º 6.027.889, patente de EE.UU. n.º 5.686.243, publicación PCT n.º WO0056927A3, y publicación PCT n.º WO9803673A1.

En algunas realizaciones, la amplificación comprende al menos un ciclo de los procedimientos secuenciales de: hibridar al menos un cebador con secuencias complementarias o sustancialmente complementarias en al menos un ácido nucleico diana; sintetizar al menos una hebra de nucleótidos de una manera dependiente del molde usando una polimerasa; y desnaturalizar el duplete de ácido nucleico formado recientemente para separar las hebras. El ciclo puede repetirse o no. La amplificación puede comprender la termociclación o puede llevarse a cabo isotérmicamente.

"Amplificación anidada" se refiere al uso de más de dos cebadores para amplificar un ácido nucleico diana.

"Amplificación semianidada" se refiere al uso de más de un cebador (por ejemplo, dos o tres) que se hibridan en un extremo de la secuencia de nucleótidos diana.

"Amplificación completamente anidada" se refiere al uso de más de un cebador que se hibrida en cada extremo de la secuencia de nucleótidos diana.

Con referencia a la amplificación anidada, los múltiples cebadores que se hibridan en un extremo de un amplicón se diferencian usando los términos "interno", "externo", e "intermedio".

Un "cebador externo" se refiere a un cebador que se hibrida a una secuencia más cercana al extremo de la secuencia de nucleótidos diana que otro cebador que se hibrida en el mismo extremo de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, la secuencia del cebador externo define el extremo del amplicón producido a partir del ácido nucleico diana. El "cebador externo" se denomina también en el presente documento "cebador flanqueante".

Un cebador interno se refiere a un cebador que se hibrida a una secuencia más cercana a la mitad de la secuencia de nucleótidos diana que otro cebador que se hibrida al mismo extremo de la secuencia de nucleótidos diana.

La expresión "cebador intermedio" se usa en el presente documento con referencia a la amplificación anidada en la que se usan al menos tres cebadores que se hibridan en un extremo de la secuencia de nucleótidos diana. Un cebador intermedio es aquel que se hibrida a una secuencia entre un cebador interno y un cebador externo.

5 Como se usa en el presente documento, El término "adyacente a" se usa para referirse a las secuencias que están en suficiente proximidad cercana para los métodos de trabajo. En algunas realizaciones, las secuencias que son adyacentes entre sí son inmediatamente adyacentes, sin nucleótidos intervinientes.

10 Una "reacción de amplificación multiplexada" es aquella en la que dos o más ácidos nucleicos distinguibles por la secuencia se amplifican simultáneamente.

15 El término "qPCR" se usa en el presente documento para referirse a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), que se conoce también como "PCR en tiempo real" o "reacción en cadena de la polimerasa cinética", todos los términos se refieren a la PCR con una detección de la señal en tiempo real.

20 Un "reactivo" se refiere ampliamente a cualquier agente usado en la reacción, diferente del analito (por ejemplo, ácido nucleico que se está analizando). Los reactivos ilustrativos para una reacción de amplificación del ácido nucleico incluyen, aunque no de forma limitativa, un tampón, iones metálicos, polimerasa, transcriptasa inversa, cebadores, molde de ácido nucleico, nucleótidos, etiquetas, colorantes, nucleasas, dNTP, y similares. Los reactivos para las reacciones enzimáticas incluyen, por ejemplo, sustratos, cofactores, un tampón, iones metálicos, inhibidores, y activadores.

25 el término "marcador", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier átomo o molécula que se puede usar para proporcionar una señal detectable y/o cuantificable. En particular, el marcador puede unirse, directa o indirectamente, a un ácido nucleico o proteína. Los marcadores adecuados que se pueden unir a las sondas incluyen, aunque no de forma limitativa, radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcadores másicos, partículas densas de electrones, partículas magnéticas, marcadores espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores, y sustratos de enzimas.

30 El término "colorante", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier molécula orgánica o inorgánica que absorbe radiación electromagnética.

35 La expresión "colorante fluorescente", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier colorante que emite radiación electromagnética de longitud de onda más larga mediante un mecanismo fluorescente tras irradiación mediante una fuente de radiación electromagnética, tal como una lámpara, un fotodiodo, o un láser u otro colorante fluorescente.

Enfoque general para aumentar la eficacia de la amplificación

40 La patente de EE.UU, n.º 8.252.558 y Harris et al., BioTechniques 54:93-97 (febrero 2013) enseñan una forma de PCR anidada, denominada "reacción de desplazamiento en cadena de la polimerasa" (PCDR). En la PCDR, cuando se produce la extensión de un cebador externo, este desplaza la hebra de extensión producida a partir de un cebador interno debido a que la reacción emplea una polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de cadenas. En teoría, esto permite un aumento mayor de 2 veces del producto de la amplificación para cada ciclo de amplificación y una sensibilidad y velocidad por tanto aumentadas sobre la PCR convencional. En la práctica, cada amplicón creado a partir de un cebador anidado no contiene un sitio de hibridación del cebador más largo para el cebador externo. Por consiguiente, la PCDR no puede sostener un aumento mayor de 2 veces del producto de la amplificación para cada ciclo de amplificación durante muchísimos ciclos. Por este motivo, la PCDR ofrece solo una modesta reducción en el número de ciclos de amplificación (por ejemplo, desde aproximadamente 23 a

45 aproximadamente 20) necesarios para detectar un ácido nucleico diana. Por el contrario, La Tabla 1 siguiente muestra que una cuadruplicación sostenida por ciclo ($4^{\text{número de ciclos}}$) debería reducir a la mitad el número de ciclos necesarios para tener la misma amplificación que una duplicación por ciclo. Una replicación sostenida de 6 veces por ciclo debe conseguir en 15 ciclos lo que tomaría 40 ciclos de la PCR normales.

55 Tabla 1 - Grado de amplificación con diferentes "bases"

ciclo	base							
	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	4	9	16	25	36	49	64	81
3	8	27	64	125	216	343	512	729
4	16	81	256	625	1296	2401	4096	6561
5	32	243	1024	3125	7776	16807	32768	59049
6	64	729	4096	15625	46656	130693	282429	531441
7	128	2187	16384	78125	279936	800000	2147000	4782969
8	256	6561	65536	380525	1578016	4813040	14185190	40340000
9	512	19683	252144	1953125	10077888	32260800	98765430	291600000
10	1024	59049	1048576	9705525	50465176	166778000	512000000	1551300000
11	2048	177147	4194304	48636125	3063E+06	1026E+06	305E+06	90E+06
12	4088	531441	15777216	2,44E+08	2,18E+08			
13	8182	1584323	57106804	1,22E+08	1,31E+10			
14	16364	4782969	2,58E+08	6,1E+08	7,94E+10			
15	32728	14348807	1,07E+09	3,05E+10	4,7E+11			
16	65536	43048721	4,28E+09	1,53E+11	2,62E+12			
17	131072	1,28E+09	1,72E+10	7,83E+11	1,68E+13			
18	262144	3,87E+09	5,67E+10	3,61E+12	1,02E+14			
19	524288	1,16E+09	2,75E+11	1,91E+13	5,08E+14			
20	1048576	3,49E+09	1,1E+12	9,54E+13	3,55E+15			
21	2087152	1,05E+10	4,4E+12	4,77E+14	2,18E+16			
22	4194304	3,14E+10	1,78E+13	2,38E+15	1,32E+17			
23	8388608	9,41E+10	7,04E+13	1,18E+15	7,9E+17			
24	16777216	2,82E+11	2,81E+14	5,85E+15	4,74E+16			
25	33554432	8,47E+11	1,13E+15	2,98E+17	2,64E+18			
26	67108864	2,54E+12	4,6E+15	1,49E+16	1,71E+20			
27	1,34E+08	7,83E+12	1,6E+16	7,45E+16	1,02E+21			
28	2,68E+08	2,28E+13	7,21E+16	3,73E+18	5,14E+21			
29	5,37E+08	6,85E+13	2,88E+17	1,65E+20	3,66E+22			
30	1,07E+09	2,05E+14	1,15E+18	9,91E+20	2,21E+23			
31	2,15E+09	6,16E+14	4,61E+18	4,95E+21	1,33E+24			
32	4,28E+09	1,85E+15	1,94E+18	2,33E+22	7,85E+24			
33	8,56E+09	5,55E+15	7,36E+18	1,10E+23	4,76E+25			
34	1,72E+10	1,67E+16	2,95E+20	5,62E+23	2,67E+26			
35	3,44E+10	5E+16	1,16E+21	2,91E+24	1,72E+27			
36	6,87E+10	1,5E+17	4,73E+21	1,45E+25	1,03E+28			
37	1,37E+11	4,5E+17	1,88E+22	7,26E+25	5,18E+28			
38	2,75E+11	1,35E+18	7,53E+22	3,54E+26	3,71E+29			
39	5,5E+11	4,05E+18	3,02E+23	1,62E+27	2,23E+30			
40	1,1E+12	1,22E+19	1,21E+24	9,08E+27	1,34E+31			

Una clave para sostener un aumento mayor de 2 veces del producto de la amplificación para cada ciclo de amplificación es diseñar el cebador interno (anidado) de tal manera que el producto de la extensión del cebador interno (anidado) contenga la secuencia del cebador externo (flanqueante). La Fig. 1 muestra un esquema en el que la PCR completamente anidada se lleva a cabo usando un cebador interno y externo directos y un cebador interno y externo directos. La "aleta" formada cuando el cebador interno se hibrida al molde contiene la secuencia del cebador externo de tal manera que cada una de las cuatro nuevas hebras generadas a partir de las dos hebras molde se extiende desde (e incluye) tanto la secuencia del cebador externo directo (o su complemento) como (e incluye) la secuencia del cebador externo inverso. Sin embargo, se requiere más de un simple apéndice de la secuencia del cebador externo en el extremo 5' del cebador interno debido a que, cuando el cebador interno se hibrida, la secuencia agregada se hibridaría también inmediatamente y bloquearía la hibridación del cebador externo. Una solución a este problema es usar un 5' adicional añadido sobre el cebador interno (es decir, una secuencia además de la secuencia del cebador externo) junto con un oligonucleótido complementario a ambas secuencias, que se denomina en el presente documento un "cierre". Para facilitar la discusión, la secuencia añadida sobre se denomina una "secuencia de cierre". Esta configuración se muestra en la Fig. 2.

La secuencia de cierre, **c**, no es homóloga con el molde (región **d'**). Aquí **c-a/c'-a'** es más estable que **a-b/a'-b'**. En algunas realizaciones, esto puede conseguirse empleando una secuencia **c** que es larga con respecto a **a**, rica en GC (es decir, más rica en GC que **a**), o contiene una o más bases estabilizantes, cuando **a** no contiene dichas bases, o más bases estabilizantes que en **a**. En algunas realizaciones, esto se puede conseguir empleando una secuencia **c** que es larga con respecto a **b**, rica en GC (es decir, más rica en GC que **b**) o contiene una o más bases

estabilizantes, cuando **b** no contiene dichas bases, o más bases estabilizantes que en **b**. en algunas realizaciones, se puede incluir una base estabilizante en la región **a** de **c-a-b**, así como en la región **a'** de **c'-a'** para potenciar la estabilidad de **c-a/c'-a'**, con respecto a **a-b/a'-b'**. Como alternativa o adicionalmente, **b** puede contener una o más bases desestabilizantes, tales como inosina. El cebador externo sigue siendo la secuencia **a**. En este caso, la

5 secuencia **a'** en el molde sigue estando disponible para el cebador externo. El cierre **c'-a'** y el extremo 5' del cebador interno se hibridarán rápidamente a una mayor temperatura que cualquiera de las otras secuencias, y por tanto, no es necesario que el cierre **c'-a'** se una al cebador interno con el fin de formar una estructura en horquilla. Sin embargo, en algunas realizaciones, el uso de un cebador interno que tiene este tipo de estructura en horquilla puede aumentar la velocidad de la reacción.

10 En algunas realizaciones, la secuencia **c** en el cebador interno (resaltada en rojo) preferentemente no se copia durante la PCR. Si es así, entonces estos nuevos moldes tendrán una cola **c'-a'** que creará con el cebador interno, un duplete **c-a-b/c'-a'-b'** que sería "ventajosa" en el contexto del desplazamiento sobre las otras estructuras posibles y, de nuevo, evita que se hibride el cebador flanqueante, secuencia **a**. Para evitar la realización de copias, la

15 secuencia en rojo puede prepararse a partir de ARN (o 2'-O-metil ARN, que es relativamente fácil de preparar sintéticamente), cuya ADN polimerasa no puede copiar bien. Esta secuencia en rojo puede prepararse a partir de cualesquiera bases capaces del emparejamiento de bases, pero que no son capaces de copiarse.

20 En algunas realizaciones, el oligonucleótido de cierre (**a'-c'**) bloquea la extensión en el extremo 3', por ejemplo, en virtud de la ausencia de un grupo 3' hidroxilo o utilizando un resto de bloqueo químico, que puede mejorar la especificidad de la amplificación.

Muestras

25 Se pueden obtener muestras que contienen ácidos nucleicos a partir de fuentes biológicas y prepararse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. En particular, los ácidos nucleicos útiles en los métodos descritos en el presente documento se pueden obtener a partir de cualquier fuente, incluyendo organismos celulares y organismo superiores tales como plantas o animales no humanos, por ejemplo, caninos, felinos, equinos, primates, y otros mamíferos no humanos, así como seres humanos. En algunas realizaciones, se pueden obtener muestras de

30 un individuo sospechoso de estar, o conocido por estar, infectados con un patógeno, un individuo sospechoso de tener, o conocido por tener, una enfermedad, tal como cáncer, o una embarazada.

Los ácidos nucleicos se pueden obtener de células, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, una fracción de sangre, orina, etc.), o muestras de tejido mediante cualquiera de varias técnicas convencionales. En algunas realizaciones, el método emplea muestras de plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, fluido peritoneal, fluido pleural, fluido oral, y secciones externas de la piel; muestras de los tractos respiratorio, intestinal genital, o urinario; muestras de lágrimas, saliva, células sanguíneas, citoblastos, o tumores. Se pueden obtener muestras de organismos vivos o muertos o de cultivos *in vitro*. Las muestras ilustrativas pueden incluir células individuales, muestras de tejidos incluidas en parafina, y biopsias extraídas por aspiración con agujas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos

40 analizados se obtienen de una única célula.

Los ácidos nucleicos de interés pueden aislarse usando métodos bien conocidos en la materia. Los ácidos nucleicos de la muestra no necesitan estar en forma pura, pero son normalmente suficientemente puros para permitir que se

45 lleven a cabo las etapas de los métodos descritos en el presente documento.

Ácidos nucleicos diana

Cualquier ácido nucleico diana que se pueda detectar mediante amplificación de ácido nucleico se puede detectar usando los métodos descritos en el presente documento. En realizaciones típicas, al menos parte de la información de la secuencia de nucleótidos será conocida para los ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, si la reacción de amplificación utilizada es la PCR, por lo general está disponible suficiente información sobre la secuencia para cada extremo de un ácido nucleico diana dado para permitir el diseño de cebadores de amplificación adecuados.

55 Las dianas pueden incluir, por ejemplo, ácidos nucleicos asociados con patógenos, tales como los virus, bacterias, protozoos u hongos; ARN, por ejemplo, aquellos para los que una expresión defectiva o excesiva es una indicación de enfermedad, lo que se expresan de manera específica de un tejido o del desarrollo; o los que están inducidos por un estímulo en particular; ADN genómico, que se puede analizar para determinar polimorfismos específicos (tales como SNP), alelos u haplotipos, por ejemplo, durante el genotipado. De particular interés son los ADN genómicos que están alterados (por ejemplo, amplificados, delecionados y/o mutados) en enfermedades genéticas u otras patologías; secuencias que están asociadas con rasgos deseables o indeseables; y/o secuencias que identifican a un individuo de forma única (por ejemplo, en determinaciones forenses o de paternidad).

Diseño de cebadores

65 Los cebadores adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos son los suficientemente largos para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de una ácido nucleico polimerasa adecuada. La longitud y

composición exactas del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo, por ejemplo, temperatura de reacción de la hibridación, origen y composición del cebador, y donde se ha utilizado una sonda, proximidad entre el sitio de hibridación de la sonda y el sitio de hibridación del cebador y relación entre las concentraciones del cebador y de la sonda. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia de ácidos nucleicos diana, un cebador de oligonucleótidos contiene normalmente un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, aunque puede contener más o menos nucleótidos. Los cebadores deberán ser lo suficientemente complementarios para hibridarse selectivamente con sus respectivas hebras y formar dupletes estables.

En general, un experto en la materia sabe cómo diseñar cebadores adecuados capaces de amplificar un ácido nucleico diana de interés. Por ejemplo, se pueden diseñar cebadores de la PCR usando cualquier programa informático comercial o programa informático de código abierto, tal como Primer3 (véase, por ejemplo, Rozen y Skaletsky (2000) *Meth. Mol. Biol.*, 132:365-386; www.broad.mit.edu/node/1060, y similares) o por acceso al sitio web de Roche UPL. Las secuencias del amplicón se introducen en el programa Primer3 con las secuencias de la sonda UPL entre paréntesis para garantizar que el programa Primer3 diseñe cebadores a ambos lados de la secuencia de la sonda entre paréntesis.

Los cebadores se pueden preparar por cualquier método apropiado, incluyendo, por ejemplo, síntesis química directa por métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; el método de la dietilfosforamida de Beaucage et al. (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; el método del soporte sólido de la patente de Estados Unidos n.º 4.458.066 y similares, o se puede proporcionar desde una fuente comercial. Los cebadores se pueden purificar usando una columna Sephadex (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ) u otros métodos conocidos por los expertos en la materia. La purificación de cebadores puede mejorar la sensibilidad de los métodos descritos en el presente documento.

Cebador externo

La Fig. 2 muestra cómo un conjunto de dos cebadores se hibrida con una primera hebra molde en un extremo de una secuencia de nucleótidos diana. Para facilitar la discusión, este conjunto de cebadores se puede considerar como un conjunto de cebadores "directo". El cebador externo incluye una secuencia **a** que se hibrida específicamente con la secuencia de la hebra molde **a'**. La Fig. 3 muestra cómo un conjunto de dos cebadores se hibrida con una segunda hebra molde en el extremo opuesto de la secuencia de nucleótidos diana. Para facilitar la discusión, este conjunto de cebadores se puede considerar como un conjunto de cebadores "inverso". Aquí, el cebador externo incluye una secuencia **e** que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **e'**. Las Figs. 4 y 5 muestran tres conjuntos de cebadores "directos" e "inversos". En la Fig. 4, el cebador externo directo incluye una secuencia **d** que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **d'**. En la Fig. 5, el cebador externo directo incluye una secuencia **d** que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **d'**. En general, las consideraciones para diseñar cebadores externos adecuados no difieren de las adecuadas para diseñar cebadores externos para su uso en PCR anidada convencional. De forma notable, en algunas realizaciones, la T_m de cualquier secuencia de cebadores que sea "externa" respecto a otra secuencia de cebadores (por ejemplo, una secuencia de cebadores interna o intermedia) es preferentemente menor que la T_m de la secuencia de cebadores interna (o intermedia). Así, por ejemplo, durante la rampa descendente de temperatura de la PCR, el cebador interno puede hibridarse y comenzar la extensión antes del cebador externo; salvo que la extensión prematura del cebador externo bloquee el sitio diana del cebador interno e impida su hibridación. Más específicamente, en la realización mostrada en la Fig. 2, la secuencia de cebadores **a** tendría una T_m menor que la de la secuencia de cebadores **b**. Análogamente, en la realización mostrada en la Fig. 3, la secuencia de cebadores **e** tendría una T_m menor que la secuencia de cebadores **f**. En algunas realizaciones, las diferencias en la T_m serían de al menos aproximadamente 4 grados, generalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 grados centígrados. En algunas realizaciones, las diferencias en la T_m están en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 15 grados centígrados. Sin embargo, la T_m del cebador externo es generalmente lo suficientemente alta para mantener una PCR eficaz, por ejemplo, en algunas realizaciones, la T_m del cebador externo es al menos 40 grados centígrados. La T_m se puede configurar ajustando la longitud de una secuencia, el contenido de G-C, y/o mediante la inclusión de una o varias bases estabilizantes o desestabilizantes en la secuencia.

"Bases estabilizantes" incluye, por ejemplo, tramos de ácidos nucleico peptídicos (PNA) que se pueden incorporar a oligonucleótidos de ADN para aumentar la estabilidad del duplete. Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y los ácidos nucleicos desbloqueados (UNA) son análogos de ARN que se pueden incorporar fácilmente a oligonucleótidos de ADN durante la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, y respectivamente aumentan y disminuyen la estabilidad del duplete. Las bases estabilizantes adecuadas también incluyen bases de ADN modificadas que aumentan la estabilidad de los pares de bases (y, por tanto, del duplete en su conjunto). Estas bases modificadas se pueden incorporar a los oligonucleótidos durante la síntesis en fase sólida y ofrecen un método más predecible de aumentar la estabilidad del duplete de ADN. Los ejemplos incluyen AP- dC (secuencia G de cierre) y 2-aminoadenina, así como 5-metilcitosina y C(5)- propinilcitosina (que sustituye la citosina), y C(5)- propiniluracilo (que sustituye la timina).

"Bases desestabilizantes" son aquellas que desestabilizan el ADN bicatenario debido a la formación de pares de bases menos estables que las típicas bases A-T y/o G-C. La ionosina (I) es una base desestabilizante porque se empareja con la citosina (C), pero un par de bases I-C es menos estable que un par de bases G-C. Esta menor estabilidad es el resultado de que la ionosina es una purina que solamente puede formar dos enlaces de hidrógeno, en comparación con los tres enlaces de hidrógeno de un par de bases G-C. Otras bases estabilizantes son conocidas, o fácilmente identificables por, los expertos en la técnica.

Cebador primario de un conjunto de dos cebadores

En referencia a la Fig. 2, el cebador interno de un conjunto de dos cebadores directos incluye una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **b'**, en la que **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en la que la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario. Esta primera hebra incluye: una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario; y una secuencia de cierre **c** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**, en la que la secuencia de cierre **c** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **d'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **a'**. En algunas realizaciones, la T_m de la secuencia combinada **c-a** (el guión se utiliza en este contexto para denotar la secuencia de ácidos nucleicos combinada constituida por las secuencias **c** y **a**) en forma bicatenaria (es decir, **c-a/c'-a'**), es mayor que la de la secuencia combinada **a-b**, en forma bicatenaria (es decir, **a-b/a'-b'**). Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, haciendo que la secuencia combinada **c-a** sea más larga y/o más rica en GC que la secuencia combinada **a-b**, y/o diseñando la secuencia combinada **c-a** para incluir más cantidad de bases estabilizantes que la secuencia combinada **a-b** (el requisito de "más" incluye la situación en la que la secuencia **a-b** no contiene pares de bases G-C ni/o bases estabilizantes). Como alternativa o adicionalmente, la secuencia combinada **a-b** se puede diseñar para incluir más cantidad de bases estabilizantes que la secuencia combinada **c-a** (el requisito de "más" incluye la situación en la que la secuencia **c-a** no contiene bases desestabilizantes). En algunas realizaciones, **a'-c'** está bloqueada para extensión en su extremo 3'.

El conjunto de dos cebadores directos se puede utilizar con un único cebador inverso convencional para una amplificación semianidada o con un conjunto de dos cebadores inversos.

En referencia a la Fig. 3, el cebador interno de un conjunto de dos cebadores inverso incluye una secuencia del cebador **f** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **F**, en la que **F** es adyacente a, y en 5' de, **e'**, y en la que la secuencia del cebador **f** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario. Esta primera hebra incluye: una secuencia del cebador **e** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **f** monocatenario; y una secuencia de cierre **g** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e**, en la que la secuencia de cierre **g** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **h'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **e'**. En algunas realizaciones, la T_m de la secuencia combinada **g-e**, en forma bicatenaria (es decir, **g-e/g'-e'**) es mayor que la de la secuencia combinada **e-f**, en forma bicatenaria (es decir, **e-f/e'-f**). Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, haciendo que la secuencia combinada **g-e** sea más larga y/o más rica en GC que la secuencia combinada **e-f**, y/o diseñando la secuencia combinada para que la T_m de la secuencia combinada **g-e**, en forma bicatenaria es mayor que la de la secuencia combinada **e-f**, en forma bicatenaria para incluir más bases estabilizantes que la secuencia combinada **e-f** (el requisito de "más" incluye la situación en la que la secuencia **e-f** no contiene pares de bases G-C y/o no contiene bases estabilizantes). Como alternativa o adicionalmente, la secuencia combinada **e-f** se puede diseñar para incluir más cantidad de bases estabilizantes que la secuencia combinada **g-e** (el requisito de "más" incluye la situación en la que la secuencia **g-e** no contiene bases desestabilizantes). En algunas realizaciones, **e'-g'** está bloqueada para extensión en su extremo 3'.

En algunas realizaciones, una o más secuencias de cierre **c** y **g**, de existir, no es/son capaz(es) de copiarse durante la amplificación. El ARN o un análogo de ARN, por ejemplo, un análogo de ARN resistente a la hidrólisis, se puede utilizar para proporcionar el emparejamiento de bases necesario para formar la secuencia de cierre bicatenaria sin que la copie una polimerasa dependiente de ADN durante la amplificación. El análogo de ARN más habituales el ARN sustituidos con 2'-O-metilo. Otros análogos de ácidos nucleicos que se pueden formar pares de bases específicos pero que no se pueden copiar incluyen ácido nucleico bloqueado (LNA) o BNA (ácido nucleico formador de puente, morfolino y ácido nucleico peptídico (PNA). Aunque estos oligonucleótidos tienen una cadena principal de azúcares diferente o, en el caso de PNA, un resto de aminoácido en lugar de la ribosa fosfato, siguen uniéndose al ARN o ADN según las reglas de emparejamiento de Watson y Crick, pero son inmunes a la actividad nucleasa. No se pueden sintetizar enzimáticamente y solamente se pueden obtener sintéticamente usando la estrategia de la fosforoamidita o, para PNA, métodos de síntesis de péptidos.

Si se desea, la secuencia de cierre **c** puede estar unida covalentemente a la secuencia complementaria **c'** de manera que **a-c/a'-c'** se forme a partir de una estructura en horquilla; sin embargo, esto no es necesario para una formación eficaz de la porción de cierre bicatenaria del cebador. Análogamente, la secuencia de cierre **g** puede, pero no necesariamente, estar unida covalentemente a la secuencia complementaria **g'** de manera que **e-g/e'-g'** se forme a partir de una estructura en horquilla.

Cebadores de un conjunto de tres cebadores

En algunas realizaciones, se puede emplear un tercer cebador en uno o ambos extremos de una secuencia de ácidos nucleicos diana para aumentar adicionalmente el número de copias producido en cada ciclo de amplificación. Las Figs. 4 y 5 muestran tres conjuntos de cebadores "directos" e "inversos". Un conjunto de tres cebadores incluye un cebador externo, como se ha analizado anteriormente, y un cebador intermedio que tiene esencialmente la misma estructura que el cebador interno anteriormente analizado. El cebador adicional es un cebador interno que está diseñado para hibridarse con la hebra en posición 5' del cebador intermedio.

El cebador interno de un conjunto de tres cebadores directos incluye una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **b'**, en la que **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**. La secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende: una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario, una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**, y la secuencia de cierre **c2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en la que la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de secuencia de la primera hebra molde **i'**. La secuencia de cierre **c2** puede ser la misma, o diferente, de la secuencia de cierre usada en el cebador interno (**c1**). En realizaciones preferidas, **c1** y **c2** son secuencias diferentes. Se aplican consideraciones similares al diseño del cebador interno en un conjunto de tres cebadores como se ha analizado anteriormente con respecto al cebador interno en un conjunto de tres cebadores, y el cebador interno en un conjunto de tres cebadores inversos (mostrado en la Fig. 5) tiene la misma estructura que el cebador interno en un conjunto de tres cebadores directos. Uno o más (o todos) los oligonucleótidos de cierre (**d'-c1'** y **a'-d'-c2'** en la Fig. 4 y **h'-g1'** y **e'-h'-g2'** en la Fig. 5) se pueden bloquear por extensión en sus extremos 3'. El conjunto de tres cebadores directos se puede utilizar con un único cebador inverso convencional para una amplificación semianidada, con un conjunto de dos cebadores inversos, o con un conjunto de tres cebadores inversos.

En algunas realizaciones, el orden de hibridación y extensión del cebador se controla basándose en la T_m de las secuencias del cebador de forma que cualquier cebador que sea "interno" con respecto a otro cebador se hibrida y comienza la extensión antes de dicho otro cebador. Así, por ejemplo, en un conjunto de dos cebadores, el cebador interno se hibrida y comienza la extensión antes del cebador externo y, en un conjunto de tres cebadores, el cebador interno se hibrida y comienza la extensión antes del cebador intermedio, y el cebador intermedio se hibrida y comienza la extensión antes del cebador externo. Por ejemplo, en la realización mostrada en la Fig. 4, las T_m de las secuencias del cebador tendrían la relación: T_m de **d** < T_m de **a** < T_m de **b**. En la realización mostrada en la Fig. 5, las T_m de las secuencias del cebador tendrían la relación: T_m de **h** < T_m de **e** < T_m de **f**. Como se ha indicado anteriormente, las T_m son función de la longitud de la secuencia, contenido de C-G y la presencia opcional de bases estabilizantes y desestabilizantes.

Se pueden diseñar cebadores anidados adicionales basándose en los principios analizados anteriormente.

Polimerasa

Los métodos divulgados utilizan una polimerasa en la amplificación. En algunas realizaciones, la polimerasa es una ARN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5' a 3'. La polimerasa se utiliza en condiciones en las que la hebra que se extiende desde un primer cebador se puede desplazar mediante la polimerización de la hebra en formación que se extiende desde un segundo cebador que es "externo" respecto al primer cebador. De manera conveniente, la polimerasa puede desplazar la hebra complementaria de la hebra molde, una propiedad denominada "desplazamiento de cadena". El desplazamiento de cadena da como resultado la síntesis de múltiples copias de la secuencia diana por molécula molde. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa para su uso en los métodos divulgados es de alto rendimiento. Las ARN polimerasas ilustrativas incluyen variantes de la ARN polimerasa Taq que carece de actividad exonucleasa 5' a 3', por ejemplo, el fragmento Stoffel de la ADN polimerasa Taq (ABI), SD polimerasa (Bioron), Taq mutante que carece de actividad exonucleasa 5' a 3' descrita en el documento USPN 5474920, Bca polimerasa (Takara), Pfx50 polimerasa (Invitrogen), Tfu ARN polimerasa (Qbiogene). Si se realiza el termociclado (como en la PCR), la ARN polimerasa es preferentemente una ADN polimerasa termoestable. La Tabla 2 siguiente relaciona las polimerasas disponibles de New England Biolabs que no tienen actividad exonucleasa 5' a 3', pero que tienen actividad de desplazamiento de cadena junto con estabilidad térmica.

Tabla 2 - Polimerasas termoestables con desplazamiento de cadena que carecen de actividad exonucleasa 5' a 3'

Polimerasa	Exonucleasa 5'—>3'	Desplazamiento de cadena	de	Estabilidad térmica
ADN polimerasa <i>Bst</i> , Fragmento grande	-	++++		+
ADN polimerasa <i>Bsu</i> , Fragmento grande	-	++		-
ADN polimerasa DEEP VENT _R TM	-	++		++++
DEEP VENT _R TM (ADN polimerasa exo-1)	-	+++		++++

(continuación)

Polimerasa	Exonucleasa 5'→3'	Desplazamiento de cadena	Estabilidad térmica
Fragmento Klenow (3'→5' exo-1)	-	+++	-
ADN polimerasa 1, Fragmento grande (Klenow)	-	++	-
Transcriptasa inversa M-MuLV	-	+++	-
ADN polimerasa phi29	-	+++++	-
ADN polimerasa THERMINATOR™	-	+	++++
ADN polimerasa VENT _R ®	-	++ ^e	+++
ADN polimerasa VENT _R ® (exo-)	-	+++ ^e	+++

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa comprende una fusión entre una polimerasa *Taq* y una porción de una topoisomerasa, por ejemplo, TOPOTAQ™ (Fidelity Systems, Inc.).

- 5 El desplazamiento de cadena también se puede facilitar mediante el uso de un factor de desplazamiento de cadena, como una helicasa. Cualquier ADN polimerasa que pueda realizar desplazamiento de cadena en presencia de un factor de desplazamiento de cadena es adecuada para su uso en el método divulgado, incluso aunque la ADN polimerasa no realice desplazamiento de cadena en ausencia de dicho factor. Los factores de desplazamiento de cadena de utilidad en los métodos descritos en el presente documento incluyen la subunidad auxiliar de polimerasa BMRF1 (Tsurumi et al., J. Virology 67(12):7648-7653 (1993)), proteína de unión a ADN de adenovirus (Zijderveld y van der Vliet, J. Virology 68(2): 1158-1164 (1994)), proteína vírica del herpes simple ICP8 (Boehmer y Lehman, J. Virology 67(2):711-715 (1993); Skaliter y Lehman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(22):10665-10669 (1994)), proteínas de unión al ADN bicatenario (SSB; Rigler y Romano, J. Biol. Chem. 270:8910-8919 (1995)), y helicasa del timo de ternera (Siegel et al., J. Biol. Chem. 267:13629-13635 (1992)). La helicasa y SSB están disponibles en formas termoestables y por tanto adecuadas para su uso en la PCR.

Amplificación

20 El conjunto de cebadores anteriormente descrito se pone en contacto con los ácidos nucleicos de la muestra en condiciones en las que los cebadores se hibridan con sus hebras molde, en el caso de estar presente. El método de amplificación de ácidos nucleicos deseado se lleva a cabo usando una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3' que es capaz de desplazamiento de cadena en las condiciones de reacción utilizadas. Esta amplificación produce amplicones que incluyen las secuencias de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación. El conjunto de cebadores se puede añadir convenientemente a la mezcla de amplificación en forma de oligonucleótidos independientes. Por ejemplo, el conjunto de dos cebadores puede consistir en tres oligonucleótidos (suponiendo que el cebador interno no incluye una estructura en horquilla) y el conjunto de tres cebadores puede consistir en cinco oligonucleótidos (suponiendo que ninguno de los cebadores interno o intermedio tenga una estructura en horquilla).

30 Para la amplificación semianidada usando un conjunto de dos cebadores, como se ha descrito anteriormente, se puede conseguir una tasa de 3^{número de ciclos} durante la fase exponencial de la PCR. La amplificación usando un conjunto de dos cebadores semianidados puede reducir el número de ciclos de amplificación necesarios para detectar una sola copia de ácido nucleico de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 42 % (por ejemplo, en un 37 %). Esto facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica con aproximadamente 23-27 ciclos de amplificación (que de otra manera podría requerir 40 o más ciclos). En algunas realizaciones, la PCR semianidada con conjunto de dos cebadores facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica en 23, 24, 25, 26, o 27 ciclos de amplificación.

40 La Tabla 3 siguiente muestra el número de ciclos necesarios para amplificar una sola copia de ácido nucleico a 10¹² copias usando las diferentes realizaciones descritas en el presente documento. Para una amplificación completamente anidada usando un conjunto de dos cebadores, como se ha descrito anteriormente, se puede conseguir una tasa de 6^{número de ciclos} en la fase exponencial de la PCR. La amplificación usando un conjunto de dos cebadores completamente anidados puede reducir el número de ciclos de amplificación necesarios para detectar una sola copia de ácido nucleico de aproximadamente el 36 % a aproximadamente el 66 % (por ejemplo, en un 61 %). Esto facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica con aproximadamente 13-17 ciclos de amplificación. En algunas realizaciones, la PCR semianidada con conjunto de dos cebadores completamente anidados facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica en 13, 14, 15, 16, o 17 ciclos de amplificación.

Tabla 3 - Reducción en el número de ciclos necesarios para la amplificación en función de la PCR Base

PCR base	número de ciclos necesarios para alcanzar 10 ¹² copias	% reducción de ciclos necesarios	límite de reducción superior (+5 %)	límite de reducción inferior (-25 %)
2	39,86	na	na	na
3	25,15	37 %	42 %	12 %
4	19,93	50 %	55 %	25 %
6	15,42	61 %	66 %	36 %
8	13,29	67 %	72 %	42 %

Para la amplificación semianidada usando un conjunto de tres cebadores, como se ha descrito anteriormente, se puede conseguir una tasa de 4^{número de ciclos} durante la fase exponencial de la PCR. La amplificación usando un conjunto de tres cebadores semianidados puede reducir el número de ciclos de amplificación necesarios para detectar una sola copia de ácido nucleico de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 55 % (por ejemplo, en un 50 %). Esto facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica con aproximadamente 20 ciclos de amplificación (que de otra manera podría requerir 40 o más ciclos). En algunas realizaciones, la PCR semianidada con conjunto de tres cebadores facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica en 18, 19, 20, 21, o 22 ciclos de amplificación.

Para la amplificación completamente anidada usando un conjunto de tres cebadores, como se ha descrito anteriormente, se puede conseguir una tasa de 8^{número de ciclos} durante la fase exponencial de la PCR. La amplificación usando un conjunto de tres cebadores completamente anidados puede reducir el número de ciclos de amplificación necesarios para detectar una sola copia de ácido nucleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 72 % (por ejemplo, en un 67 %). Esto facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica con aproximadamente 11-15 ciclos de amplificación. En algunas realizaciones, la PCR completamente anidada con conjunto de tres cebadores facilita la detección de una sola copia de ácido nucleico en una muestra biológica en 9, 10, 11, 12, o 13 ciclos de amplificación.

En algunas realizaciones, la etapa de amplificación se realiza usando la PCR. Para realizar reacciones de la PCR en tiempo real, las mezclas de reacción contienen generalmente un tampón adecuado, una fuente de iones magnesio (Mg²⁺) en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, nucleótidos y, opcionalmente, detergentes y estabilizantes. Un ejemplo de un tampón adecuado es un tampón TRIS a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 85 mM, prefiriéndose una concentración de 10 mM a 30 mM. En una realización, la concentración de tampón TRIS es de 20 mM en forma de la mezcla de reacción de doble concentración (2X). La mezcla de reacción puede tener un intervalo de pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0, donde un intervalo de pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 8,5 es lo habitual. La concentración de nucleótidos puede estar en el intervalo de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 1000 mM, normalmente en el intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 800 mM. Los ejemplos de concentraciones de dNTP son 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 mM. Detergentes tales como Tween 20, Triton X 100, y Nonidet P40 también se pueden incluir en la mezcla de reacción. Agentes estabilizantes tales como ditiotreitól (DTT), reactivo de Cleland) o mercaptoetanol también se pueden incluir. Además, las mezclas maestras pueden contener opcionalmente dUTP así con uracilo ADN glicosilasa (uracil-N-glicosilasa, UNG). Una mezcla maestra está comercialmente disponible de Applied Biosystems, Foster City, CA, (TaqMan® Universal Master Mix, números de catálogo 4304437, 4318157 y 4326708).

Estrategias de marcado

En los métodos descritos en el presente documento se puede utilizar cualquier estrategia de marcado. Cuando la reacción se analiza para determinar la presencia de un producto de amplificación único, se puede utilizar una sonda de detección universal en la mezcla de amplificación. En realizaciones particulares, la detección por PCR en tiempo real se puede llevar a cabo usando una sonda universal qPCR. Las sondas universales qPCR adecuadas incluyen colorantes de ADN bicatenario, tal como SYBR Green, Pico Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), Eva Green (Biotinum), bromuro de etidio y similares (véase Zhu et al., 1994, *Anal. Chem.* 66:1941-48).

En algunas realizaciones, se utilizan una o más sondas qPCR específicas de la diana (es decir, específicas de una secuencia de nucleótidos diana a detectar) en las mezclas de amplificación para detectar los productos de amplificación. Con una selección razonada de etiquetas, se pueden realizar análisis en los que las diferentes marcas se excitan y/o se detectan a diferentes longitudes de onda en una sola realización ("reacción multiplexada"). Véase, por ejemplo, Fluorescence Spectroscopy (Pesce et al., Eds.) Marcel Dekker, Nueva York, (1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach, Marcel Dekker, Nueva York, (1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2^a ed., Academic Press, Nueva York, (1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules, Academic Press, Nueva York, (1976); Indicators (Bishop, Ed.) Pergamon Press, Oxford, 19723; y Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Eugene (1992).

En algunas realizaciones, puede ser conveniente incluir marcas en uno o más de los cebadores utilizados en la mezcla de amplificación.

5 **Automatización y sistemas ilustrativos**

En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana se detecta usando una plataforma automatizada para la manipulación y/o análisis de muestras. En algunas realizaciones, se utilizan plataformas de análisis automatizados comerciales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA) se utiliza.

10 Los métodos descritos en el presente documento están ilustrados para su uso con el sistema GeneXpert. Los métodos ilustrativos de preparación y análisis de muestras se describen a continuación. Sin embargo, la presente invención no está limitada a un método de detección o plataforma de análisis en particular. Un experto en la materia reconoce que se pueden utilizar numerosas plataformas y métodos.

15 El GeneXpert® utiliza un cartucho autocontenido de un solo uso. La extracción, amplificación y detección de la muestra se puede llevar a cabo, todas ellas, dentro de "laboratorio en un cartucho" autocontenido. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.958.349, 6.403.037, 6.440.725, 6.783.736, 6.818.185;

20 Los componentes del cartucho incluyen, aunque no de forma limitativa, cámaras de procesamiento que contienen reactivos, filtros y tecnologías de captura útiles para extraer, purificar y amplificar ácidos nucleicos diana. Una válvula permite la transferencia de fluidos de una cámara a otra y contiene componentes para la lisis y la filtración de ácidos nucleicos. Una ventana óptica permite la detección óptica en tiempo real. Un tubo de reacción permite un ciclado térmico muy rápido.

25 En algunas realizaciones, el sistema GenXpert® incluye una pluralidad de módulos para su escalabilidad. Cada módulo incluye una pluralidad de cartuchos, junto con componentes de manipulación y análisis de muestras.

30 Una vez que la muestra se ha añadido al cartucho, la muestra se pone en contacto con tampón de lisis y el ácido nucleico liberado se une a un sustrato de unión a ácidos nucleicos tal como un sustrato de sílice o de vidrio. A continuación, el sobrenadante de la muestra se retira y el ácido nucleico se eluye con un tampón de elución tal como un tampón Tris/EDTA. A continuación, el eluato se puede procesar en el cartucho para detectar los genes diana como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el eluato se utiliza para reconstituir al menos parte de los reactivos, que están presentes en el cartucho como partículas liofilizadas.

35 En algunas realizaciones, se utiliza la PCR para amplificar y detectar la presencia de uno o más ácidos nucleicos diana. En algunas realizaciones, la PCR utiliza la polimerasa Taq con función de inicio caliente, tal como AptaTaq (Roche).

40 En algunas realizaciones, se utiliza una centrifugación fuera de línea para mejorar los resultados del ensayo con muestras de bajo contenido celular. La muestra, con o sin el tampón añadido, se centrifuga y el sobrenadante se retira. A continuación, el aglomerado se resuspende en un volumen más pequeño de sobrenadante, tampón u otro líquido. El aglomerado resuspendido se agrega a continuación al cartucho GeneXpert® como se ha descrito anteriormente.

45 **Kits**

También se contempla un kit para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento. Dichos kits incluyen uno o más reactivos útiles para llevar a la práctica cualquiera de estos métodos. Un kit incluye por lo general un envase con uno o más recipientes que contienen los reactivos, en forma de una o más composiciones separadas u, opcionalmente, como una premezcla cuando lo permita la compatibilidad de los reactivos. El kit también puede incluir otro(s) material(es) que pueden ser deseables desde el punto de vista de un usuario, tales como tampón(ones), diluyente(s), patrón(ones), y/o cualquier otro material útil para el procesamiento de la muestra, lavado o realización de cualquier otra etapa del ensayo.

55 Los kits incluyen preferentemente instrucciones para llevar a cabo uno o más de los métodos de cribado descritos en el presente documento. Las instrucciones incluidas en los kits se pueden fijar al material de envasado o se pueden incluir como un prospecto. Aunque las instrucciones son normalmente materiales escritos o impresos, esto no se limita a los mismos. Se puede utilizar cualquier medio para almacenar dichas instrucciones y comunicarlas al usuario final. Dichos medios incluyen, aunque no de forma limitativa, medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD, ROM) y similares. Como se usa en el presente documento, el término "instrucciones" puede incluir la dirección de un sitio de Internet que proporciona las instrucciones.

65 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Confirmación del efecto del oligonucleótido de "cierre" sobre la estructura cebador/diana

Se llevó a cabo un experimento en el que la T_m se midió para un oligonucleótido cebador (aunque denominado un "cebador", no se utiliza como tal en este experimento) y una secuencia diana complementaria con o sin el oligonucleótido "de cierre" presente. El oligonucleótido diana se sintetizó con una marca fluorescente en 5' (fluoresceína) y el cebador incorporaba un reactivo inactivador de la fluorescencia (véase la Fig 6). El rojo indica la presencia de una cadena principal de 2' O-metilo. Las secuencias de oligonucleótido analizadas se relacionan en la Tabla 4 siguiente. La T_m de la región helicoidal más a la derecha mostrada en las estructuras de la Fig. 6 se midió siguiendo el aumento de la fluorescencia que resulta al aumentar la temperatura y el flúor y el inactivador se separan mediante hibridación de la región de la doble hélice.

Si la región de la unión del cebador a la diana estuviera, como se indica en la Fig. 6A, limitada por la secuencia de cierre a una unión b/b', entonces se predeciría que la T_m de dicha región fuera mucho más baja que en la situación de la Fig. 6B con una unión ab/a'b'. En la Tabla 4 siguiente se relacionan los oligonucleótidos utilizados en este experimento y en el siguiente. En la Tabla 5 están las T_m previstas y observadas para los oligonucleótidos cebador y diana, en presencia o ausencia de un oligonucleótido de cierre.

Tabla 4 - Oligonucleótidos utilizados

N.º de oligonucleótido	Secuencia	Categoría
16140	5'ggcgcuccggaccggcgTAGGCTGGTAACCAACCGCTGAAGGCA(U01)ACGG3' (nota: minúsculas = 2'-O-metilo; U01 = uracilo marcado con el inactivador dabculo)	cebador
16141	ggcgcuccggaccggcgTAGGCTGGTAACCAACCGCTGAAGGCA(U01)A-3'	cebador
16142	5'TGGTTACCAGCCTACGCCGTCCGGAGCGCC3'bloqu*	cierre
16145	5'Fluoresceína-CCGTATGCCTTCAGCGGTTGGTTACCAGCCTACGCATT3'	diana
16146	5'Fluoresceína-TATGCCTTCAGCGGTTGGTTACCAGCCTACGCATT3'	diana
16147	5'CGTAGGCTGGTAACC3'	cebador de flaqueo
16148	5'GCGTAGGCTGGTAACC3'	cebador de flaqueo
16149	5'GCGT(A01)GGCTGGT(A01)ACC3' (A01 = 2-aminopurina)	cebador de flaqueo

*bloque = resto que bloquea la extensión

20

Tabla 5 - Mediciones de la T_m

Cebador	Diana	Cierre	T _m prevista (° C)	T _m observadas (° C)
16140	16145	Ninguna	76,4 (ab/a'b')	78,5
16141	16146	Ninguna	74,6 (ab/a'b')	78,0
16140	16145	16142	68,3 (b/b')	67,0
16141	16146	16142	62,0 (b/b')	66,5

25

Las condiciones de todos los análisis de hibridación fueron: Tris - HCl 0,01 mM, KCl 0,05 M y MgCl₂ 0,006 M. Todos los oligonucleótido estaban a 1 micromolar. Las mezclas de oligonucleótidos de la Tabla 4 anterior se calentaron a 95 °C y se enfriaron lentamente a 45 °C y la fluorescencia de la fluoresceína se siguió usando el Cepheid SmartCycler™. La T_m se determinó como la temperatura a la que el cambio de la fluorescencia era máximo.

30

Las T_m de b/b' y ab/a'b' se predijeron con un programa informático (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer). Las T_m observadas fueron consistentes con una estructura en la que la región d'-a' de la diana, en presencia de un oligonucleótido de cierre, permanece monocatenaria y disponible para la hibridación.

La presencia de un cebador de flaqueo (16147 a 16149) también a 1 micromolar, como se esquematiza en la Fig. 7A, supuso pocas diferencias sobre las T_m medidas.

35

Ejemplo II: Extensibilidad del cebador externo (de flaqueo)

La extensibilidad del cebador externo (de flaqueo) mostrada esquemáticamente en la Fig. 7A se analizó en las condiciones mostradas en la Tabla 6 en una reacción de la PCR.

Tabla 6

Reacción	Cebador de flaqueo
1	16147
2	16148
3	16149
4	ninguno

- Todas las reacciones contenían Tris-HCl 10 mM, 0,125 mM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 0,15 micromolar del oligonucleótido cebador 16140 de la Tabla 1, anteriormente, 0,125 micromolar del oligonucleótido diana 16145 de la Tabla 1, 0,125 micromolar del oligonucleótido de cierre 16142 de la Tabla 1, KCl 45 mM, MgCl₂ 3,5 mM, 14 unidades de AmpliTaqCS, que tiene actividad ADN polimerasa, pero ninguna actividad exonucleasa 5' a 3' ni 3' a '5, y 15 unidades de un anticuerpo dirigido contra la polimerasa Taq, que proporciona un 'inicio caliente' activado por temperatura a la reacción de incorporación.
- 5
- 10 0,125 mM o nada de cebador de flaqueo se añadió según la Tabla 6 anterior; las reacciones se siguieron en el tiempo usando el SmartCycler mientras la temperatura aumentaba hasta 95 grados para separar los oligonucleótidos y activar simultáneamente la polimerasa, disminuyendo después la temperatura hasta 60 grados para permitir que los oligonucleótidos se hibridaran y se produjera la extensión de cualquiera a de los cebadores. Los resultados se muestran en 6B. Las tres trazas crecientes son reacciones separadas con cierres ligeramente diferentes; La traza plana es sin la externa (flanqueante), presente en el cebador que se desplaza. Estos resultados indican que se produce una reacción de desplazamiento de cadena que desplaza el inactivador cuando el cadena externo (de flaqueo) está presente.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de cebadores de ácidos nucleicos para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en donde el ácido nucleico diana comprende una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en donde la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, comprendiendo el primer conjunto oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos dos primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en donde los al menos dos primeros cebadores comprenden un primer cebador externo y un primer cebador interno, comprendiendo el primer cebador externo una secuencia de cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**; y comprendiendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en donde **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en donde la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:
- una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario; y una secuencia de cierre **c** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**, en donde la secuencia de cierre **c** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **d'**, que es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **a'**, en donde el conjunto de cebadores comprende opcionalmente al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde.
2. Un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el ácido nucleico diana comprende una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en la que la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto la muestra con:
- (i) al menos dos primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en donde los al menos dos primeros cebadores comprenden un primer cebador externo y un primer cebador interno, comprendiendo el primer cebador externo una secuencia de cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**; y comprendiendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en donde **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en donde la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:
- una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario; y una secuencia de cierre **c** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**, en donde la secuencia de cierre **c** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **d'**, que es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **a'**; y
- (ii) al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde, en donde la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones en las que los cebadores se hibridan con sus hebras molde, si están presentes; y
- (b) amplificar el ácido nucleico diana, de existir, usando una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'- 3', en condiciones donde se produce el desplazamiento de las hebras, para producir amplicones que comprenden las secuencias que se extienden desde la secuencia molde **a'** hasta el sitio de unión del segundo cebador.
3. El conjunto de cebadores de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde la ADN polimerasa comprende una actividad de desplazamiento de cadenas, opcionalmente en donde la T_m de la secuencia combinada **c-a**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **a-b**, en forma bicatenaria y/o la secuencia combinada **c-a** es más rica en GC que la secuencia combinada **a-b**, y/o contiene más bases estabilizantes.
4. El método de la reivindicación, 2 o la reivindicación 3, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $3^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR, opcionalmente en donde dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente un 12 % - 42 % menos de ciclos de amplificación de lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.
5. El conjunto de cebadores de las reivindicaciones 1 o 3 o el método de las reivindicaciones 2-4, en el que el segundo cebador comprende oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos dos segundos cebadores capaces de hibridarse con la segunda hebra molde, en donde los al menos dos segundos cebadores comprenden un segundo cebador externo y un segundo cebador interno,

comprendiendo el segundo cebador externo una secuencia del cebador **e** que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **e'**; y

comprendiendo el segundo cebador una secuencia del cebador **f** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **f'**, en donde **f'** es adyacente a, y en 5' de, **e'**, y en donde la secuencia del cebador **f** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

una secuencia del cebador **e** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **f** monocatenario; y
 una secuencia de cierre **g** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e**, en donde la secuencia de cierre **g** no es complementaria de la secuencia de la segunda hebra molde **h'**, que es adyacente a, y en 3', de la secuencia de la segunda hebra molde **e'**,

opcionalmente en donde la T_m de la secuencia combinada **g-e**, en forma bicatenaria es mayor que la de la secuencia combinada **e-f**, en forma bicatenaria y/o en donde la secuencia combinada **g-e** es más rica en GC que la secuencia combinada **e-f**, y/o contiene más bases estabilizantes.

6. El conjunto de cebadores o el método de la reivindicación 5, en donde dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $6^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR, opcionalmente en donde dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente un 36 % - 66 % menos de ciclos de amplificación de lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

7. El conjunto de cebadores, o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la(s) secuencia(s) de cierre **c** y **g**, de existir, no puede(n) copiarse durante la amplificación, opcionalmente en donde:

- (a) la(s) secuencia(s) **c** y/o **g**, de existir, comprende(n) 2'-O-metil ARN; o
- (b) la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno y/o el segundo cebador interno, de existir, no comprende una secuencia en horquilla; o
- (c) la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno comprende una secuencia en horquilla en donde la secuencia de cierre **c** está unida a la secuencia complementaria **c'** y/o la secuencia del cebador bicatenario del segundo cebador interno, de existir, comprende una secuencia en horquilla en donde la secuencia de cierre **g** está unida a la secuencia complementaria **g'**.

8. Un conjunto de cebadores de ácidos nucleicos para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en donde el ácido nucleico diana comprende una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en donde la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, comprendiendo el primer conjunto oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos tres primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en donde los al menos tres primeros cebadores comprende un primer cebador externo, un primer cebador intermedio, y un primer cebador interno,

comprendiendo el primer cebador externo una secuencia del cebador **d** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **d'**;

comprendiendo el primer cebador intermedio una secuencia del cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**, en donde **a'** es adyacente a, y en 5' de, **d'**, y en donde la secuencia del cebador **a** monocatenario está unida en su extremo 5' en una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a** monocatenario; y
 una secuencia de cierre **c1** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en donde la secuencia de cierre **c1** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **i'**, que es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **d'**; y

comprendiendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en donde **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en donde la que la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario;
 una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**; y
 una secuencia de cierre **c2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en donde la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de la secuencia de la primera hebra molde **i'**, en donde el conjunto de cebadores comprende opcionalmente al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde.

9. Un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el ácido nucleico diana comprende una primera hebra molde y, opcionalmente, una segunda hebra molde, en donde la segunda hebra molde es complementaria de la primera hebra molde, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra con:

5 (i) al menos tres primeros cebadores capaces de hibridarse con la primera hebra molde, en donde los al menos tres primeros cebadores comprenden un primer cebador externo, un primer cebador intermedio y un primer cebador interno, comprendiendo el primer cebador externo una secuencia del cebador **d** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **d'**;

10 comprendiendo el primer cebador intermedio una secuencia del cebador **a** que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **a'**, en donde **a'** es adyacente a, y en 5' de, **d'**, y en donde la secuencia del cebador **a** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

15 una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a** monocatenario; y una secuencia de cierre **c1** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en donde la secuencia de cierre **c1** no es complementaria de una secuencia de la primera hebra molde **i'**, es adyacente a, y en 3' de, la secuencia de la primera hebra molde **d'**; y

20 comprendiendo el primer cebador interno una secuencia del cebador **b** monocatenario que se hibrida específicamente con una secuencia de la primera hebra molde **b'**, en donde **b'** es adyacente a, y en 5' de, **a'**, y en donde la secuencia del cebador **b** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

25 una secuencia del cebador **a** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **b** monocatenario; una secuencia del cebador **d** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **a**; y una secuencia de cierre **c2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **d**, en donde la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de la secuencia de la primera hebra molde **i'**; y

30 (ii) al menos un segundo cebador capaz de hibridarse específicamente con la segunda hebra molde,

en donde la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones en las que los cebadores se hibridan con sus hebras molde, si están presentes; y

35 (b) amplificar el ácido nucleico diana, de existir, usando una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', en condiciones donde se produce el desplazamiento de las hebras, para producir amplicones que comprenden las secuencias que se extienden desde la secuencia molde **a'** hasta el sitio de unión del segundo cebador.

40 10. El conjunto de cebadores de la reivindicación 8, o el método de la reivindicación 9, en el que la ADN polimerasa comprende una actividad de desplazamiento de cadenas, opcionalmente en donde **g1** tiene una secuencia diferente de **g2**, opcionalmente en donde la T_m de la secuencia combinada **c1-d**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **d-a**, en forma bicatenaria, y la T_m de la secuencia combinada **c2-d-a**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **d-a-b**, en forma bicatenaria y/o la secuencia combinada **c1-d** es más rica en GC que la secuencia combinada **d-a**, y/o contiene más bases estabilizantes, y la secuencia combinada **c2-d-a** es más rica en GC que la secuencia combinada **d-a-b**, y/o contiene más bases estabilizantes que la secuencia combinada **d-a-b**.

50 11. El método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $4^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR, opcionalmente en donde dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente un 25 % - 55 % menos de ciclos de amplificación de lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

55 12. El conjunto de cebadores o el método de las reivindicaciones 9-11, en el que el segundo cebador comprende oligonucleótidos en la forma de, o capaces de formar, al menos tres segundos cebadores capaces de hibridarse con la segunda hebra molde, en donde los al menos tres segundos cebadores comprenden un segundo cebador externo, un segundo cebador intermedio, y un segundo cebador interno, comprendiendo el segundo cebador externo una secuencia del cebador **h** que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **h'**;

60 comprendiendo el segundo cebador intermedio una secuencia del cebador **e** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la segunda hebra molde **e'**, en donde **e'** es adyacente a, y en 5' de, **h'**, y en donde la secuencia del cebador **e** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

65 una secuencia del cebador **h** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e** monocatenario; y una secuencia de cierre **g1** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **h**, en donde la secuencia de cierre **g1** no es complementaria de una secuencia de la segunda hebra molde **j'**, es adyacente a, y en 3', de la

secuencia de la segunda hebra molde **h'**; y

comprendiendo el segundo cebador una secuencia del cebador **f** monocatenario que se hibrida específicamente con la secuencia de la primera hebra molde **f'**, en donde **f'** es adyacente a, y en 5' de, **e'**, y en donde la secuencia del cebador **f** monocatenario está unida en su extremo 5' a una primera hebra de una secuencia del cebador bicatenario que comprende:

una secuencia del cebador **e** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **f** monocatenario;

una secuencia del cebador **h** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **e**; y

una secuencia de cierre **g2** adyacente a, y en 5' de, la secuencia del cebador **h**, en donde la secuencia de cierre **c2** no es complementaria de la secuencia de la primera hebra molde **j'**.

13. El conjunto de cebadores o el método de la reivindicación 12, en el que la T_m de la secuencia combinada **g1-h**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **h-e**, en forma bicatenaria, y la T_m de la secuencia combinada **g2-h-e**, en forma bicatenaria, es mayor que la de la secuencia combinada **h-e-f**, en forma bicatenaria y/o en donde la secuencia combinada **g1-h** es más rica en GC que la secuencia combinada **h-e**, y/o contiene más bases estabilizantes, y la secuencia combinada **g2-h-e** es más rica en GC que la secuencia combinada **h-e-f**, y/o contiene más bases estabilizantes que la secuencia combinada **h-e-f**.

14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que dicha amplificación amplifica el ácido nucleico diana a una velocidad de hasta $8^{\text{número de ciclos}}$ durante la fase exponencial de la PCR, opcionalmente en donde dicha amplificación permite la detección de una única copia de ácido nucleico en una muestra biológica en aproximadamente un 42 % - 72 % menos de ciclos de amplificación de lo que se requeriría para dicha detección usando solo un único cebador directo y un único cebador inverso.

15. El conjunto de cebadores o el método de las reivindicaciones 8-14, en el que las secuencias de cierre **c1** y **c2**, y **g1** y **g2**, de existir, no pueden copiarse durante la amplificación, opcionalmente en donde:

(a) las secuencias de cierre **c1** y **c2**, y **g1** y **g2**, de existir, comprenden 2'-O-metil ARN; o

(b) la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno y el primer cebador intermedio; y/o el segundo cebador interno y el segundo cebador intermedio, de existir, no comprende(n) una secuencia en horquilla; o

(c) la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador interno comprende una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **c2** está unida a la secuencia complementaria **c2'**; y/o la secuencia del cebador bicatenario del primer cebador intermedio comprende una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **c1** está unida a la secuencia complementaria **c1'**; y/o la secuencia del cebador bicatenario del segundo cebador interno, de existir, comprende una secuencia en horquilla en la que la secuencia de cierre **g2** está unida a la secuencia complementaria **g2'**; y/o la secuencia del cebador bicatenario del segundo cebador intermedio, de existir, comprende una secuencia en horquilla en donde la secuencia de cierre **g1** está unida a la secuencia complementaria **g1'**.

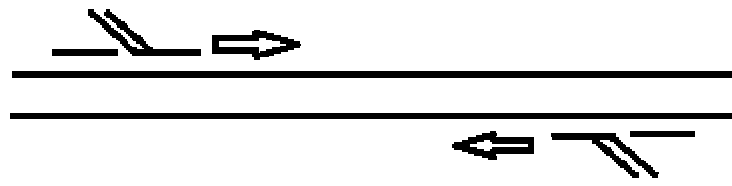


Fig. 1

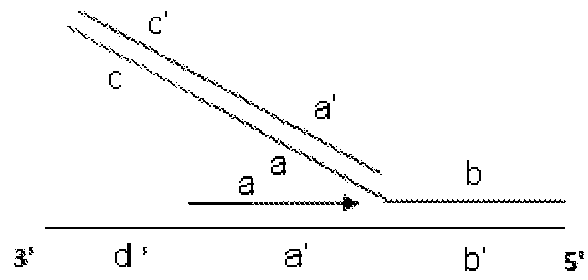


Fig. 2

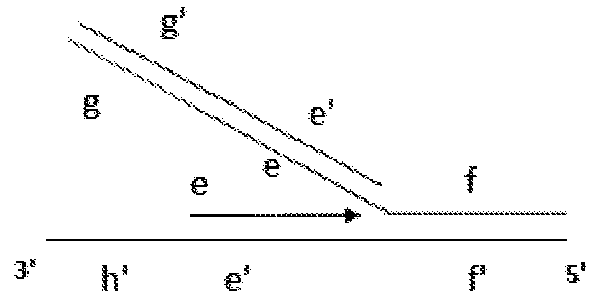


Fig. 3

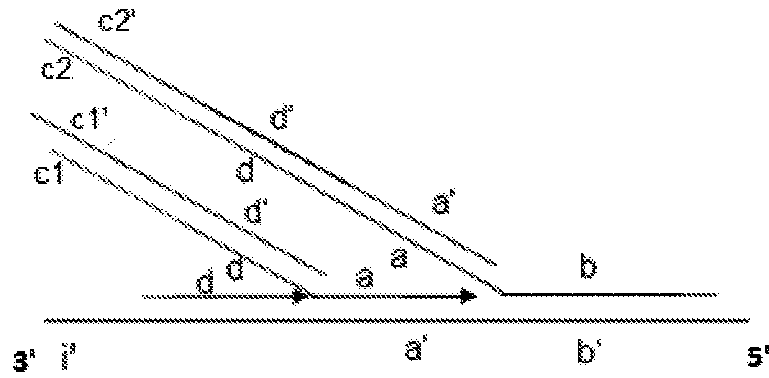


Fig. 4

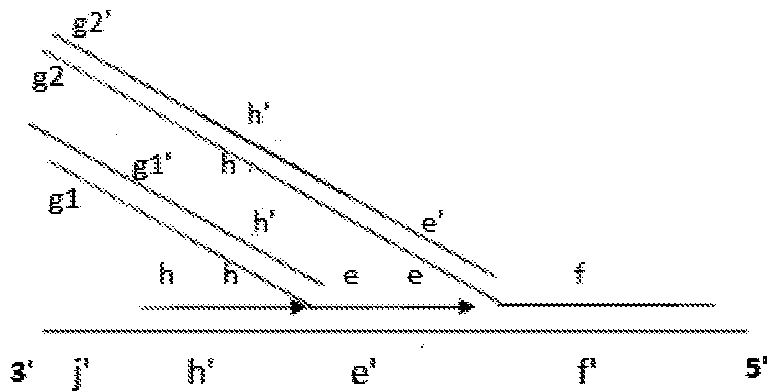


Fig. 5

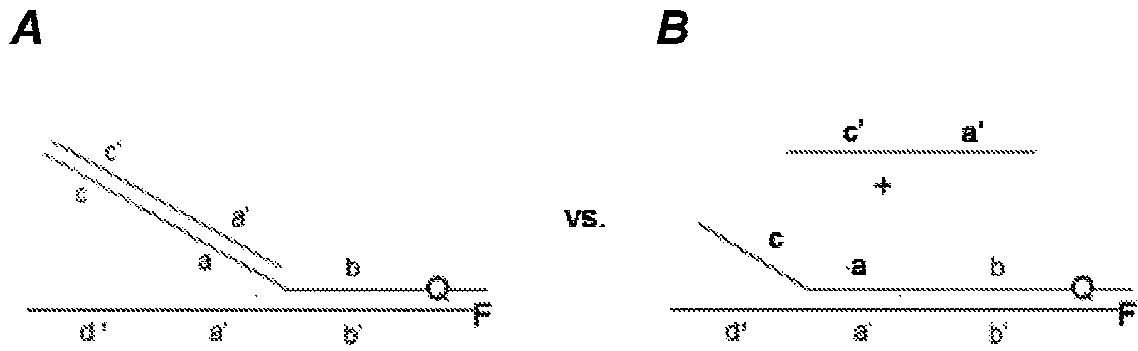
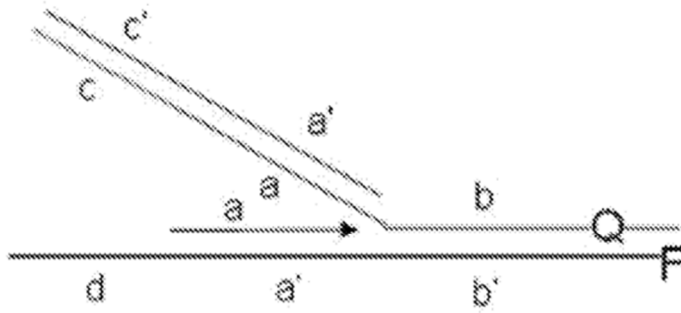


Fig. 6A-B

A



B

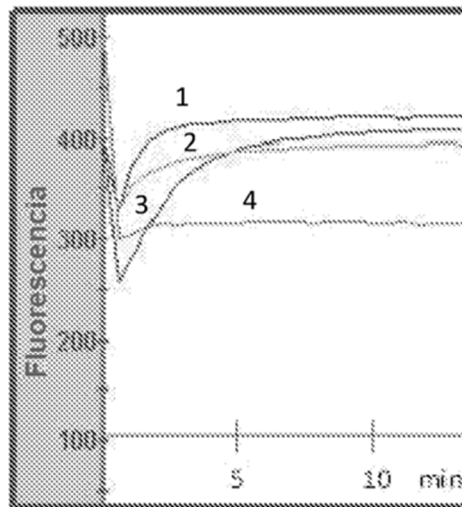


Fig. 7A-B